Nachweis von Veränderungen an Ribosomen von Escherichia coli, bedingt durch unterschiedliche Zellwuchsbedingungen beziehungsweise durch Mutationen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ellen Deusser

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547025_0071

Nachweis von Veränderungen an Ribosomen von Escherichia coli, bedingt durch unterschiedliche Zellwuchsbedingungen beziehungsweise durch Mutationen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ellen Deusser

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Professor Dr. H.G. Wittmann
2. Referent: Professor Dr. E.R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1 - 3
Material und Methoden	4 - 9
Teil A : Veränderungen in der Proteinzusammensetzung von Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli, bedingt durch veränderte Wuchsraten der Zellen	10
Einführung in das Problem	11 - 13
Ergebnisse und Diskussion:	
a) Vergleich der ribosomalen Proteine aus verschiedenen Medien aufgrund ihrer "Quotienten"	14 - 18
b) Vergleich der ribosomalen Proteine aus verschiedenen Medien aufgrund ihrer "Anzahl von Kopien"	18 - 21
c) Charakterisierung der Proteine L7/L12, S6 und S21	22 - 23
d) Schlußfolgerungen	23 - 26
Zusammenfassung	27 - 28
Teil B : Veränderte ribosomale Proteine in Mutanten des Bakteriums Escherichia coli	29
Einführung in das Problem	30 - 32

	Seite
Ergebnisse und Diskussion:	30 - 32
a) Streptomycinunabhängige Mutanten	33 - 37
b) spezielle Eigenschaften einer str^i Mutante	38 - 40
c) Temperatursensitive Mutanten	41
d) Schlußfolgerungen	41 - 42
Zusammenfassung	43
Diskussion	44 - 48
Literaturverzeichnis	49 - 55
Abkürzungsverzeichnis	56

Einleitung

Nachdem bekannt war, daß Ribosomen entscheidend an der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Zamecnik, 1960), wurden zahlreiche Versuche gemacht, um die Struktur dieser Zellpartikeln aufzuklären. Die Untersuchungen wurden vorwiegend an Bakterienribosomen, vor allem von Escherichia coli durchgeführt. Das E.coli-Ribosom, das aufgrund seiner Sedimentationskonstanten als 70S-Partikel bezeichnet wird, zerfällt bei geringen Magnesiumkonzentrationen in vitro in zwei verschiedene Untereinheiten, die 30S- und 50S-Partikel (Tissières et al., 1958; Tissières et al., 1959). Der molekulare Aufbau dieser beiden Untereinheiten ist heute weitgehend bekannt: Die 30S-Partikel setzt sich zusammen aus einer 16S-rRNS und 21 ribosomalen Proteinen; die 50S-Partikel besteht aus einer 23S-rRNS und 34 ribosomalen Proteinen. Diese 55 ribosomalen Proteine wurden alle isoliert (Kaltschmidt et al.,1967; Traut et al.,1967; Fogel and Sypherd, 1968; Moore et al., 1968; Hardy et al., 1969; Traut et al., 1969; Hindennach et al.,1971ab; Mora et al., 1971) und ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften weitgehend erforscht (Craven et al., 1969; Dzionara et al., 1970; Kaltschmidt et al., 1970; Kaltschmidt and Wittmann, 1970b; Mora et al., 1971). Sie sind bis auf eine Ausnahme voneinander vollkommen verschieden: Im Gegensatz zu den RNS-Komponenten ist die Proteinzusammensetzung der Ribosomen sehr komplex. Diese Tatsache ließ

vermuten, daß die einzelnen Proteine bestimmte Teilfunktionen in der sehr komplexen Proteinbiosynthese übernehmen.

Alle Versuche, die sich mit der Aufklärung der Funktion ribosomaler Proteine beschäftigen, haben nur Gültigkeit für die in vitro Situation dieser Partikeln, d. h. im zellfreien System. In vielen Funktionsanalysen wird die Struktur der Ribosomen so stark verändert, daß nicht ohne weiteres auf die in vivo Bedeutung der Ergebnisse geschlossen werden kann (Nomura et al., 1969; Craven et al., 1969; Retsema and Conway, 1969; Hasenbank et al., 1972). Zwei Methoden scheinen die Möglichkeit zu bieten, in vitro und in vivo Funktionen von Proteinen parallel zu untersuchen.

Die erste Methode basiert auf der Tatsache, daß nicht alle Ribosomen alle ribosomalen Proteine gleichzeitig besitzen (Voynow and Kurland, 1971; Weber, 1972). Es wird vermutet, daß bestimmte Proteine dem Ribosom nur dann anhaften, wenn sie für eine bestimmte Funktion benötigt werden. In vitro können durch Zugabe bestimmter fehlender Proteine, d.h. durch Erhöhung der aktiven Partikeln, bestimmte Funktionen stimuliert werden (van Duin and Kurland, 1970; Randall-Hazelbauer and Kurland, 1972; van Duin et al., 1972). In vivo könnte durch Veränderung der Umweltbedingungen, die die Zelle zu anderen Leistungen nötigt, eine Veränderung in der Menge der mehr oder weniger benötigten ribosomalen Proteine auftreten; sie könnte Aufschluß über deren Funktion geben.

Eine Voraussetzung muß allerdings gegeben sein, es muß nachgewiesen werden, daß Ribosomen auch in vivo heterogen sind. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Problem in Teil A behandelt.

Die zweite Methode beschäftigt sich mit der Untersuchung von ribosomalen Mutanten. Durch die Mutation wird eine bestimmte Komponente, z. B. ein ribosomales Protein, und dadurch gleichzeitig eine bestimmte ribosomale Funktion, z. B. Verhalten gegen Antibiotika, verändert. Durch die Identifizierung der veränderten Komponente läßt sich eine Korrelation zwischen Struktur und Funktion aufstellen. In Teil B der Arbeit wird eine Reihe von ribosomalen Mutanten auf Veränderungen in ribosomalen Proteinen untersucht.

Material und Methoden

Bakterienstämme: Zur Untersuchung der Heterogenität von Bakterienribosomen in Teil A der Arbeit wurden die Stämme Escherichia coli (E.coli) K12 arg^- $RNase1^-$ (Stamm A19 von Gesteland, 1966) und E. coli B lys^- (erhalten von Dr. G. Nass, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) verwendet. In Teil B der Arbeit wurden die ribosomalen Proteine folgender Stämme auf Veränderungen durch Mutationen untersucht: Als Wildtyp diente E. coli K StammAB774 streptomycinsensitiv (str^s); von einer streptomycinabhängigen (str^d) Mutante (Stamm N522) dieses Wildtyps wurden 14 Rückmutanten zu Streptomycinunabhängigkeit (str^i) untersucht und zwar die Stämme N421 bis N434 (Deusser et al., 1971). Ausserdem wurden die temperatursensitiven (sts) Mutanten N4003, N4050, N4106, N4128, N4306, N4308, N4310, N4312, N4334, N4335, N4435 des Wildtyps E. coli K12 Stamm D10 getestet (Phillips et al., 1969).

Medien: Das verwendete Komplett-Medium setzte sich zusammen aus 7,5g/l Yeast extract (Difco), 7,5g/l Peptone (Difco), 5g/l NaCl, 1g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. Zur Anzucht aller Stämme aus Teil B wurden zusätzlich 2g/l Casaminoacids (Difco) zugegeben. Das verwendete Minimal-Medium enthielt 5g/l Glukose, 7g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 3g/l KH_2PO_4, 1g/l NH_4Cl, 0,8g/l Na_2SO_4, 7mg/l $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 100mg/l $MgCl_2$, 5mg/l $CaCl_2$, und 50mg/l der benötigten Aminosäure (Apirion, 1966).

Puffer: Der Ribosomenpuffer zur Aufbereitung von 70S-Partikeln enthielt $1x10^{-2}$M Tris-HCl pH 7,8; $6x10^{-2}$M KCl; $6x10^{-3}$M Mercaptoaethanol; $1x10^{-2}$M $Mg(CH_3COO)_2$.
Der Dissotiationspuffer diente zur Aufbereitung von 30S- und 50S-Partikeln. Er entsprach dem Ribosomenpuffer mit Ausnahme von Mg^{++}: $1x10^{-3}$M $Mg(CH_3COO)_2$ für Stamm E.coli K12 und die Mutantenstämme und $5x10^{-4}$M $Mg(CH_3COO)_2$ für E. coli B.

Wuchsbedingungen: Zellen von E. coli K12 oder E. coli B wurden in Komplett-Medium bzw. in Minimal-Medium angezogen; pro Medium wurden 2x300 ml Kultur in 1l-Erlenmeyerkolben bei 37°C im Rotationsschüttelwasserbad (Modell G76, New Brunswick Scientific Co.) bebrütet. Die Generationszeit der Zellen in Komplett-Medium betrug 25 min, in Minimal-Medium 50 min, die lag-Phase 45 min bzw. 300 min. Die Zellen wurden während der mittleren logarithmischen Phase geerntet ($2x10^8$ Zellen/ml) und bei -20°C aufbewahrt.
Zellen der Mutanten und deren Wildtyp wurden unter den gleichen Bedingungen angezogen, jedoch in Komplett-Medium, das mit 2g/l Casamino-acids (Difco) angereichert war. Diese Kulturen wurden während der 3/4 logarithmischen Phase geerntet ($4x10^8$ Zellen/ml).

Zur Markierung der Zellen wurde dem Wuchsmedium entweder L-^{14}C-Aminosäure-Gemisch (NEC 445; 0,1mC/ml 0,1N HCl; Fa. NEN) oder L-^{3}H-Aminosäure-Gemisch (NET 250; 1,0mC/ml 0,1N HCl; Fa. NEN) für mindestens drei Generationen zugegeben und zwar in den Mengen:

a) 0,9 μ C ^{14}C-Aminosäuren pro ml Komplett-Medium und
0,5 μ C ^{3}H-Aminosäuren pro ml Minimal-Medium oder
b) 2,0 μ C ^{3}H-Aminosäuren pro ml Komplett-Medium und
0,18 μ C ^{14}C-Aminosäuren pro ml Minimal-Medium.

Isolierung von Ribosomen und ribosomalen Proteinen: Die verschieden markierten Zellen aus den beiden Medien (ca. 1,5g Zellen pro Kultur) wurden zusammengegeben, bei 4°C während 2 min mit 1,5 facher Menge Aluminiumoxid (Alcoa, A 305) zerrieben und in 4 facher Menge Puffer aufgenommen und zwar in Ribosomenpuffer zur Gewinnung von 70S-Partikeln bzw. in Dissoziationspuffer zur Gewinnung von 30S- und 50S-Partikeln. Die Suspensionen wurden 2 x 20 min bei 12000g und 1 x 20 min bei 30000g zentrifugiert und der Bodensatz verworfen.

a) Zur Gewinnung von 70S-Partikeln wurde der Überstand 150 min bei 150000g zentrifugiert, der Bodensatz wieder in Ribosomenpuffer aufgenommen und ein zweites Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. In Kontrollexperimenten wurden die Zellen, die in Parallelkulturen in gleichem Medium gezogen, aber unterschiedlich markiert waren, zusammengegeben und die 70S-Partikeln wie oben isoliert.

b) Zur Gewinnung von 30S- und 50S-Partikeln wurden 1,0 ml bis 1,5 ml des Überstandes (150 bis 200 o.D.$_{260}$) auf einen linearen Gradienten (10% bis 30% Saccharose in $1x10^{-3}$M $Mg(CH_3COO)_2$) aufgetragen und 15 Stunden bei 19000 rpm in einem Rotor SW-27 zentrifugiert. Aus den Fraktionen von je 0,8 ml wurden die Untereinheiten abgetrennt und für 21 Stunden bei 150000g sedimentiert.

Zur Extraktion der ribosomalen Proteine wurden die Ribosomen (70S-Partikeln bzw. Untereinheiten) in 67%iger Essigsäure, die $1x10^{-1}$M $Mg(CH_3COO)_2$ enthielt, auf eine Endkonzentration von etwa 10 mg/ml gebracht, die RNS durch 45 min Rühren bei 0°C gefällt und abzentrifugiert (1 x 30 min bei 26000g). Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde aufbewahrt, das Sediment wurde noch zweimal unter gleichen Bedingungen gewaschen, jeweils der Überstand dem ersten Proteinextrakt beigegeben und das Endsediment verworfen. Die Proteinlösungen wurden in einem Rotationsverdampfer bei 10°C auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml für das 30S-Proteingemisch, auf 1,7mg/ml für das 50S-Proteingemisch bzw. auf 3 mg/ml für das 70S-Proteingemisch eingeengt. Die Lösungen wurden in einen Dialyseschlauch (Union Carbid Corp.) gefüllt und gegen 4 x 350 ml des Auftragsgels für die Elektrophorese je 1,5 Stunden dialysiert.

Die Fraktionierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann (1970). Es wurden 0,4 ml des gegen Auftragsgel dialysierten Proteingemischs (s. o.) pro Elektrophorese eingesetzt. In der ersten Dimension werden die Proteine bei pH 8,6 in einem 8%igen Acrylamidgel vornehmlich aufgrund ihrer molekularen Ladungen getrennt, während in der zweiten Dimension bei pH 4,6 und 18%igem Acrylamidgel vorzugsweise die Molekülgröße die Trennung bestimmt. Die fraktionierten Proteine wurden in der Gelplatte mit Amidoschwarz angefärbt (s.a. Kaltschmidt und Wittmann, 1970). In Teil A der Arbeit wurde die

Radioaktivität für jede Komponente nach einer von zwei Methoden bestimmt.

Bestimmung der Radioaktivität in den Proteinkomponenten:

Methode I) Jeweils 100 mg Gel mit dem eingeschlossenen Protein wurden ausgestanzt, zerkleinert und 0,15 ml destilliertes Wasser und 2 ml Soluene (Packard Solubilizer) zugegeben. Zur Extraktion der Proteine wurden die Proben während 15 Stunden bei 40°C geschüttelt und anschließend mit 10 ml Szintillator, der 7 g PPO und 0,4 g POPOP pro Liter Toluol enthielt, aufgefüllt (PPO = 2,5 Diphenyloxazol, POPOP = 2,2p-Phenylen-bis-5-Phenyloxazol).

In einem Packard-Szintillationszähler mit automatischer Quench-Kontrolle (Modell 3380) wurden für jedes Protein die Impulse gemessen und die Zerfälle pro Minute (dpm) berechnet. Bei Wiederholung der Extraktionsmethode bzw. bei Verbrennung des einmal extrahierten Gels wie unter Methode II (s. unten) beschrieben, wurde keine weitere Radioaktivität gefunden.

Methode II) Die fraktionierten Proteine wurden jeweils vollständig mit dem Gel ausgeschnitten, bei 70°C während zwei Tagen getrocknet und mit reinem Sauerstoff in einem Packard Sample Oxidizer (Tricarb Modell 305) verbrannt. Mit Hilfe dieser Methode wurde $^{3}H_2O$ von $^{14}CO_2$ getrennt und in verschiedenen Probengläschen aufgefangen. In die $^{3}H_2O$-Gläschen wurden 15 ml Instagel gefüllt. $^{14}CO_2$ wurde in 3 ml zweifach destilliertem Aethanolamin absorbiert und mit 9 ml Methanol und 9 ml Szintillator aufgefüllt.

Der Szintillator enthielt 11 g PPO und 0,6 g POPOP pro Liter Toluol. Die dpm in $^{3}H_2O$ und in $^{14}CO_2$ wurden für jedes Protein bestimmt wie unter I angegeben.

Berechnung der "Quotienten" und "Anzahl von Kopien" für die einzelnen ribosomalen Proteine: Aus den nach Methode I oder II ermittelten ^{14}C-dpm und ^{3}H-dpm wurde der Quotient (Verhältnis) gebildet. Er gibt an, in welchem Mengenverhältnis ein Protein in der Ribosomenpopulation aus Komplett-Medium zu der Ribosomenpopulation aus Minimal-Medium vorkommt.
Um einen Vergleich der Quotienten aus verschiedenen Experimenten zu ermöglichen, wurde für die Quotienten aller Proteine aus einem Experiment der Median berechnet, gleich 1,0 gesetzt und die Quotienten aller Proteine aus diesem Experiment darauf bezogen. Der Median ist definiert als der Wert, der eine Anordnung so aufteilt, daß eine gleiche Anzahl von Einzelwerten auf beiden Seiten dieses Wertes liegt (Croxton, 1953). Die Einzelwerte wurden in der Reihenfolge ihrer Größe angeordnet.

Es wurde weiterhin die Anzahl von Kopien für jedes ribosomale Protein aus Komplett-Medium berechnet. Sie ist definiert als das Produkt aus dem Massenbruch eines Einzelproteins durch sein Molekulargewicht und der Gesamtmenge Protein pro Mol Ribosomen (zur Berechnung s. Weber, 1972).

T e i l A

Veränderungen in der Proteinzusammensetzung von Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli bedingt durch veränderte Wuchsraten der Zellen.

Einführung in das Problem

Stöchiometrische Untersuchungen an isolierten E.coli-Ribosomen haben gezeigt, daß diese Partikeln in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung heterogen sind: Nicht alle Proteine, die aus einer Ribosomenpopulation isoliert werden können, sind in allen Partikeln enthalten (Voynow and Kurland, 1971; Weber, 1972). Diese Befunde lassen vermuten, daß dem Ribosom bestimmte Proteine nur dann anhaften, wenn sie für eine bestimmte Funktion während der Proteinbiosynthese benötigt werden. Um diese Hypothese zu stützen, müßte nachgewiesen werden, daß Ribosomen nicht nur in vitro, sondern auch in vivo heterogen sind.

Es wurden daher zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, daß die bisher an isolierten Ribosomen gefundene Heterogenität nicht auf die angewandten Isolationsmethoden zurückzuführen ist. Im einzelnen gibt es folgende Hinweise: a) Aus quantitativen Immuno-Praezipitationstesten wurde geschlossen, daß während eines Reinigungsschritts des Ribosoms weniger als 2% der ribosomalen Proteine verloren gehen (Stöffler, pers. Mitteilung). Dieser Befund wird bestätigt durch die Tatsache, daß b) sehr viele ribosomale Proteine in stöchiometrischen Untersuchungen in konstanten Mengen gefunden wurden, unabhängig davon, ob sehr sorgfältig gereinigte oder weitgehend ungereinigte Partikeln verwendet wurden (Voynow and Kurland, 1971). c) Des weiteren zeigen Versuche, die die Funktion

von Ribosomen in vitro betreffen, daß hochgereinigte ribosomale Partikeln genauso aktiv sind, wie ungereinigte Partikeln (Kurland et al., 1969). Alle diese Befunde lassen darauf schließen, daß bei der Reinigung mindestens viele Proteine nicht sukzessiv abgewaschen werden. d) Obwohl somit ribosomale Proteine offensichtlich "stabil" an das Ribosom gebunden sind, wurde ein Austausch von ribosomalen Proteinen gefunden, wenn diese unfraktioniert im Überschuß einer Ribosomenfraktion zugegeben wurden (Kurland et al., 1969): Die Möglichkeit ist gegeben, daß sich die Proteinzusammensetzung von Ribosomen unter bestimmten Bedingungen verändert. e) Endlich spricht die Tatsache, daß eben die ribosomalen Proteine, die zur Bildung einer physikalisch intakten 30S-Partikel unbedingt nötig sind (Nomura et al., 1969), auch in einem Verhältnis von einem Molekül pro Partikel vorkommen (Voynow and Kurland, 1970; Weber, 1972) dagegen, daß ribosomale Proteine verloren gehen.
Experimente, die die Funktionen einzelner ribosomaler Proteine betreffen, stützen die Vermutung, daß Ribosomen auch in vivo heterogen sind (van Duin and Kurland, 1970; Randall-Hazelbauer and Kurland, 1972; van Duin et al., 1972).

Alle hier angeführten Hinweise machen es unwahrscheinlich, daß während der Reinigung ribosomaler Partikeln bedeutsame Mengen an ribosomalen Proteinen abgewaschen werden. Keine dieser Untersuchungen kann aber eine verbindliche Aussage machen über den Verlust an ribosomalem Protein

während des Aufbrechens der Zellen. Gerade dieser erste Schritt kann aber eine starke Veränderung der physiologischen Bedingungen für die Ribosomen bedeuten.
Um zusätzlich auch diese Fehlerquelle zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchungen gemacht: Zellen des Bakteriums E. coli wurden sowohl in Komplett-Medium unter Zugabe von ^{14}C- (bzw. ^{3}H-) Aminosäuren als auch in Minimal-Medium unter Zugabe von ^{3}H- (bzw. ^{14}C-) Aminosäuren angezogen. Nach dem Ernten wurden die verschieden markierten Zellen aus den beiden Medien zusammengegeben und gemeinsam aufgebrochen. Die Ribosomen wurden isoliert, die ribosomalen Proteine extrahiert und das Proteingemisch aufgetrennt mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese. Diese Methode erlaubt eine schnelle und gute Auftrennung fast aller ribosomaler Proteine. Die einzelnen Proteinkomponenten wurden aus der Gelplatte ausgeschnitten und der Gehalt an Radioaktivität als "Zerfälle pro Minute" (dpm) bestimmt. Die so unter identischen Bedingungen isolierten ribosomalen Proteine sind durch die gemäß ihrer Herkunft verschiedene Markierung unterscheidbar und können quantitativ miteinander verglichen werden. Wenn die Proteinzusammensetzung der Ribosomen aus Komplett- bzw. Minimal-Medium identisch ist, so sollten die Quotienten ^{14}C-dpm zu ^{3}H-dpm (bzw. ^{3}H-dpm zu ^{14}C-dpm) gleich sein für alle Proteine. Abweichungen einzelner Proteine von diesem konstanten Wert zeigen an, daß diese Proteine in den Ribosomen verschiedener Herkunft quantitativ verschieden stark vertreten sind.

Ergebnisse und Diskussion

a) Vergleich der ribosomalen Proteine aus verschiedenen Medien aufgrund ihrer Quotienten

Die Quotienten aus den ermittelten ^{14}C-dpm zu ^{3}H-dpm (bzw. ^{3}H-dpm zu ^{14}C-dpm) wurden in sechs verschiedenen Versuchen bestimmt. Die Ergebnisse für die Proteine der 30S-Untereinheit sind in Tabelle 1, für die Proteine der 50S-Untereinheit in Tabelle 2 angegeben. Aufgrund dieser Quotienten können die ribosomalen Proteine in insgesamt vier Klassen eingeteilt werden:

I) Bei etwa 70% aller Proteine liegen die Werte zwischen 0,90 und 1,10. Die Streuung von $\pm$ 10% liegt innerhalb der Differenz, die in Kontrollexperimenten ermittelt wurde (s. Spalte 8 und 9). Die relative Konstanz in dem Quotienten bedeutet, daß diese Proteine in Ribosomenpopulationen aus verschiedenen Medien (Komplett- oder Minimal-Medium) gleich häufig vorkommen.

II) Die Quotienten einer größeren Gruppe von Proteinen weicht um 10% bis 25% von dem Medianwert ab. Dieser Unterschied tritt mindestens in zwei Experimenten und in dem Mittelwert aus allen Versuchen (Spalte 7) auf. Gruppe II läßt sich in zwei Untergruppen aufteilen:

a) Die Quotienten für die Proteine S1 und die Proteine L8+L9, L17, L27, L32 und L33 liegen zwischen 1,10 und 1,25. Dies bedeutet, daß in Ribosomen, die in Komplett-Medium gebildet wurden, diese Proteine anteilmäßig stärker vertreten sind.

b) Im Gegensatz hierzu liegen die Werte für die Proteine

S10, S19 und S20 zwischen 0,75 und 0,90. Diese Proteine sind in Ribosomen aus Minimal-Medium in größerer Menge vorhanden.

III) Die Quotienten für die Proteine L7 und L16 liegen ebenfalls zwischen 0,75 und 0,90. Für diese beiden Proteine wurden diese Werte aber im Gegensatz zu Gruppe IIb in allen Versuchen gefunden.

IV) Eine relativ kleine Gruppe von Proteinen zeigt in ihrem Quotienten eine Abweichung von 200% bis 300% vom Medianwert. Hierzu gehören die Proteine S6 mit einem Quotienten von 2,46, S21 mit 2,36 und L12 mit 3,10. Diese Proteine sind demzufolge in Ribosomen aus Komplett-Medium zwei bis drei Mal so stark vertreten wie in Ribosomen aus Minimal-Medium.

In drei der in Tabelle 1 und 2 angeführten Experimente wurden die ribosomalen Proteine aus Komplett-Medium mit ^{14}C-Aminosäuren und aus Minimal-Medium mit ^{3}H-Aminosäuren markiert. Zur Kontrolle wurde die Markierung in den übrigen drei Experimenten umgekehrt gewählt. Das Verhältnis "Komplett-Medium zu Minimal-Medium" ist in allen sechs Versuchen für die einzelnen Proteine gleichsinnig, unabhängig davon, ob die entsprechende Markierung ^{14}C zu ^{3}H oder ^{3}H zu ^{14}C ist. Dies bedeutet, daß die Abweichung der Werte in Gruppe II, III und IV nicht z.B. auf unterschiedliche Markierung bestimmter Aminosäuren in den ^{14}C- und ^{3}H-Aminosäure-Gemischen zurückzuführen ist.

Tabelle 1: Vergleich der 30S-Proteine isoliert aus Zellen mit unterschiedlicher Wuchsrate durch Berechnung ihrer "Quotienten"

Protein	70S		Untereinheiten					70S Kontrollen	
	Methode I		Methode I		Methode II				
	$\frac{KM\ ^{14}C}{MM\ ^{3}H}$	$\frac{KM\ ^{3}H}{MM\ ^{14}C}$	$\frac{KM\ ^{14}C}{MM\ ^{3}H}$	$\frac{KM\ ^{3}H}{MM\ ^{14}C}$	$\frac{KM\ ^{14}C}{MM\ ^{3}H}$	$\frac{KM\ ^{3}H}{MM\ ^{14}C}$	Mittelwert	$\frac{MM\ ^{3}H}{MM\ ^{14}C}$	$\frac{KM\ ^{3}H}{KM\ ^{14}C}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	1,22	1,25	-	-	-	-	1,24	1,00	1,00
S2	1,13	1,08	-	-	0,99	1,04	1,06	0,92	0,97
S3	1,05	0,98	0,98	-	0,99	1,01	1,00	0,96	0,92
S4	1,04	1,06	1,00	-	0,97	1,00	1,01	0,95	0,98
S5	1,00	1,07	0,93	1,16	0,94	0,94	1,00	0,97	0,97
S6	2,00	2,93	-	-	-	-	2,46	0,79	1,01
S7	0,95	1,00	1,04	-	1,02	1,01	1,00	1,00	0,96
S8	0,89	0,88	0,97	1,00	0,89	0,89	0,92	1,01	0,99
S9	0,96	0,98	1,07	-	1,06	1,00	1,01	0,96	1,01
S10	0,87	0,75	0,93	-	0,76	-	0,83	1,01	0,95
S11	-	-	1,22	-	-	-	1,22	1,01	-
S12	-	0,99	-	1,02	-	0,99	1,01	-	-
S13	0,87	0,95	0,88	1,00	1,09	1,03	0,97	1,02	1,02
S14	0,96	0,78	1,00	0,80	1,19	1,11	0,97	1,01	0,98
S15	0,97	1,06	1,07	0,97	1,01	0,97	1,01	1,03	1,13
S16	1,06	0,96	1,00	-	0,99	1,00	1,00	1,00	0,93
S17	0,95	1,02	1,01	-	0,96	0,94	0,99	1,04	0,98
S18	0,87	0,94	1,06	-	1,01	0,91	0,94	1,00	0,94
S19	0,77	0,73	0,89	-	1,03	0,88	0,86	0,96	0,99
S20	0,79	0,96	0,79	0,-	0,89	0,89	0,84	1,05	1,02
S21	2,50	2,21	2,44	2,97	2,44	1,62	2,36	1,09	1,09

Legende zu Tabelle 1 und 2: a) 70S = Die Proteine wurden aus der 70S-Ribosomenfraktion isoliert; b) Untereinheiten = Die Proteine wurden aus der 30S- bzw. 50S-Fraktion isoliert. C) Methode I, II = Die Menge an ^{14}C bzw ^{3}H wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt (s. Material und Methoden); d) KM ^{14}C (^{3}H) = Radioaktivität, gefunden in den ribosomalen Proteinen aus Zellen, die in Komplett-Medium angezogen und mit ^{14}C- (^{3}H) Aminosäuren markiert waren; e) MM ^{14}C (^{3}H) = dgl. für Minimal-Medium; f) Der Mittelwert wurde berechnet als arithmetisches Mittel aus den Werten in Reihe 1 - 6; g) Abweichungen im Quotienten zwischen 10% - 25% sind einmal, größere Abweichungen zweimal unterstrichen.

Tabelle 2: Vergleich der 50S-Proteine isoliert aus Zellen mit unterschiedlicher Wuchsrate durch Berechnung ihrer"Quotienten"

Protein	70S MethodeI		Untereinheiten MethodeI		Untereinheiten MethodeII		Mittelwert	70S Kontrollen	
	$\frac{KM\,^{14}C}{MM\,^{3}H}$	$\frac{KM\,^{3}H}{MM\,^{14}C}$	$\frac{KM\,^{14}C}{MM\,^{3}H}$	$\frac{KM\,^{3}H}{MM\,^{14}C}$	$\frac{KM\,^{14}C}{MM\,^{3}H}$	$\frac{KM\,^{3}H}{MM\,^{14}C}$		$\frac{MM\,^{3}H}{MM\,^{14}C}$	$\frac{KM\,^{3}H}{KM\,^{14}C}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L1	1,05	0,91	1,03	-	0,97	1,00	0,99	0,95	1,01
L2	1,05	1,04	0,97	-	1,01	1,07	1,03	0,98	1,07
L3	1,03	0,99	0,90	1,01	0,98	0,93	0,97	1,01	1,03
L4	1,04	0,96	1,00	-	0,95	0,94	0,98	0,95	1,01
L5	0,98	0,99	0,93	-	0,98	0,96	0,98	0,99	1,02
L6	1,00	0,96	1,12	-	1,04	0,99	1,02	0,97	1,12
L7	0,88	0,87	0,64	-	0,72	0,82	0,78	0,97	0,98
L8+ L9	1,20	1,12	1,21	1,20	1,07	1,22	1,17	0,99	0,95
L10	1,09	1,18	1,11	1,04	1,05	1,03	1,08	1,02	1,00
L11	0,96	1,04	0,92	0,88	0,88	0,87	0,93	1,04	0,96
L12	2,64	2,80	2,63	-	3,40	3,03	3,10	0,92	0,96
L13	1,01	0,94	0,95	1,02	0,97	0,93	0,97	1,00	1,02
L14	1,05	1,03	1,00	1,00	1,02	1,03	1,02	-	1,00
L15	0,96	0,96	0,94	1,04	0,98	1,05	0,99	1,00	0,99
L16	0,86	0,78	0,75	-	0,78	0,85	0,80	1,01	0,96
L17	1,14	1,05	0,96	1,15	1,21	1,11	1,10	1,04	0,97
L18	1,03	1,02	1,05	1,00	1,04	0,98	1,02	0,99	1,00
L19	0,98	1,08	1,11	1,21	-	1,08	1,09	0,99	1,08
L20	1,03	0,95	-	-	-	-	0,99	0,96	1,07
L21	0,94	1,09	-	-	1,01	0,95	1,00	0,99	1,02
L22	1,00	0,97	-	1,06	0,93	0,99	0,99	1,01	1,03
L23	0,81	0,97	0,91	-	0,93	0,92	0,91	1,03	1,00
L24	0,94	0,93	0,98	0,90	0,91	0,97	0,94	0,99	1,13
L25	0,99	0,95	1,01	-	1,02	0,89	0,97	1,00	1,14
L26	-	0,98	-	-	1,09	-	1,04	1,02	1,02
L27	-	1,07	1,15	-	1,16	1,11	1,12	1,05	1,06
L28	-	0,93	1,11	-	1,02	1,03	1,02	1,06	1,05
L29	1,09	0,97	1,00	-	0,95	0,81	0,96	1,01	-
L30	-	0,87	1,02	-	0,95	1,01	0,94	1,04	-
L32	1,05	1,22	1,04	-	1,16	1,13	1,12	1,03	-
L33	-	1,24	1,25	-	1,16	1,18	1,21	1,01	1,00

Legende zu Tabelle 2: s. Tabelle 1; Die Proteine L8 und L9 wurden unter den gewählten Bedingungen der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese nicht getrennt. Der Quotient ist aus der Radioaktivität L8 + L9 berechnet. Protein L31 wurde in allen Experimenten nicht gefunden.

b) Vergleich der ribosomalen Proteine aus verschiedenen Medien aufgrund ihrer "Anzahl von Kopien"

In allen bisherigen Arbeiten, in denen ribosomale Heterogenität nachgewiesen wurde (Voynow and Kurland, 1970; Weber, 1972), ist die Anzahl von Kopien (copies) für die einzelnen Proteine angegeben. Dieser Wert ist definiert als: Anzahl Moleküle eines ribosomalen Proteins pro ribosomales Partikel (wegen Einzelheiten s. Weber, 1972). Um einen Vergleich der hier aufgeführten Ergebnisse mit den Werten aus anderen Arbeiten zu ermöglichen, wurden in den vorliegenden Versuchen die Anzahl der Kopien bestimmt und zwar für die aus Komplett-Medium isolierten ribosomalen Proteine. Sie sind zusammen mit den Werten für Minimal-Medium, die von Weber (1972) bestimmt wurden, in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Vergleicht man die Werte für Komplett- und Minimal-Medium, so ergibt sich, daß ein deutlicher Unterschied für die Proteine S20, L7 und L16 sowie für die Proteine S6, S21 und L12 zu finden ist. Mit Ausnahme von S20 sind dies die gleichen ribosomalen Proteine, deren Quotienten am deutlichsten von dem Medianwert abweichen, d.h., die die Gruppen III und IV bilden (s. oben).

Die Proteine S6 und S21 haben 0,1 Kopien in Minimal-Medium und 0,25 bzw. 0,3 Kopien in Komplett-Medium. Sie sind in beiden Fällen als "fractional" Proteine zu bezeichnen (zur Klassifizierung der Proteine s. Tabelle 3 und 4). Protein L12 hat 0,9 Kopien in Komplett- und 0,3 Kopien in Minimal-Medium. Es muß im ersten Fall als "unit" im zweiten als "fractional" bezeichnet werden. Es zeigt sich hier, daß die Einstufung ribosomaler Proteine aufgrund ihrer Kopien nicht absolut ist, sondern z.B. abhängig sein kann von den Wuchsbedingungen. Dasselbe gilt für die Proteine S20 und L16, die mit 0,6 Kopien in Ribosomen aus Komplett-Medium "fractional" und mit 0,8 Kopien in Ribosomen aus Minimal-Medium "unit" Proteine sind. L7 kann in beiden Fällen als "fractional repeated" eingestuft werden, da es mit 1,3 Kopien für Komplett- und mit 1,7 Kopien für Minimal-Medium gefunden wird.

Tabelle 3 : Stöchiometrische Werte für 30S-ribosomale Proteine, die in Komplett- (KM) bzw. Minimal-Medium (MM) synthetisiert wurden

	Anzahl von Kopien		Klassifizierung	
Protein	KM	MM	KM	MM
S1	0,1	0,1	F	F
S2	0,4	0,4	F	F
S3	0,75	0,75	M	M
S4	1,2	1,2	U	U
S5	1,2	1,2	U	U
S6	0,25	0,1	F	F
S7	1,0	1,0	U	U
S8	1,0	1,0	U	U
S9+S11	1,6	1,55	(U+F)	(U+F)
S10	0,6	0,6	F	F
S12	0,2	0,2	F	F
S13	0,7	0,7	M	M
S14	0,4	0,4	F	F
S15+S16+S17	3,1	3,1	(3xU)	(3xU)
S18	0,4	0,35	F	F
S19	0,5	0,5	F	F
S20	0,6	0,8	F	U
S21	0,3	0,12	F	F

Legende zu Tabelle 3 und 4 : Die Anzahl von Kopien wurde für ribosomale Proteine aus Zellen, die in Komplett-Medium (KM) gewachsen waren, berechnet und mit der Anzahl von Kopien der ribosomalen Proteine aus Minimal-Medium (MM), die von Weber (1972) bestimmt wurden, verglichen. Die Proteine wurden nach ihrer Anzahl von Kopien klassifiziert: 0,1 - 0,6 Kopien = "fractional"; 0,7 Kopien = "marginal"; 0,8 - 1,2 Kopien = "unit"; 1,3 - 1,7 Kopien = "fractional repeated" und 1,8 - 2,2 Kopien = "repeated" entsprechend den Zeichen F, M, U, FR und R. Für weitere Einzelheiten s. Weber (1972).

Tabelle 4: Stöchiometrische Werte für 50S-ribosomale Proteine, die in Komplett- (KM) bzw. Minimal-Medium (MM) synthetisiert wurden

	Anzahl von Kopien		Klassifizierung	
Protein	KM	MM	KM	MM
L1	1,1	1,1	U	U
L2	0,9	0,9	U	U
L3	1,4	1,4	FR	FR
L4	0,9	0,9	U	U
L5	1,4	1,4	FR	FR
L6	1,2	1,15	U	U
L7	1,3	1,7	FR	FR
L8+L9	1,4	1,4	?	?
L10	1,0	0,95	U	U
L11	1,2	1,15	U	U
L12	0,9	0,3	U	F
L13	1,4	1,4	FR	FR
L14	0,8	0,8	U	U
L15	1,6	1,55	FR	FR
L16	0,6	0,8	F	U
L17	1,2	1,2	U	U
L18	2,2	2,2	R	R
L19	1,1	1,05	U	U
L21	0,9	0,85	U	U
L22	1,7	1,65	FR	FR
L23	1,2	1,2	U	U
L24	1,6	1,6	FR	FR
L25	1,4	1,4	FR	FR
L26	0,2	0,2	F	F
L27	0,9	0,75	U	M
L28	0,5	0,45	F	F
L29	1,1	1,1	U	U
L30	0,9	0,9	U	U
L32	0,6	0,6	F	F
L33	0,6	0,6	F	F

Legende zu Tabelle 4: s. Tabelle 3

c) Charakterisierung der Proteine L7/L12, S6 und S21

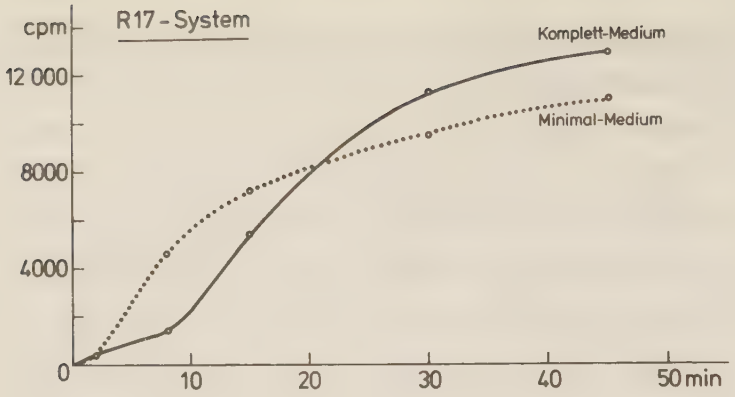
Die drei Proteine mit der größten Abweichung, nämlich S6, S21 und L12, sind von anderen Autoren näher auf ihre Struktur und/oder Funktion untersucht worden. Von Terhorst et al.,(1971) wurde gezeigt, daß die Primärstrukturen von Protein L12 und L7 fast identisch sind. Der einzige Unterschied zwischen beiden Proteinen besteht in der Markierung des N-terminalen Endes von L7 durch eine Acetyl-Gruppe. Von Kischa et al. (1971) wurde nachgewiesen, daß beide Proteine an der gleichen Funktion beteiligt sind, sie stimulieren verschieden stark die Aktivität eines Enzyms des Proteinbiosynthesesystems, der G-Faktor-abhängigen GTPase. Man kann annehmen, daß L12 und L7 das gleiche Protein ist, das in zwei verschiedenen Funktionszuständen im Ribosom vorliegt (Thammana et al., 1972). Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse in den vorliegenden Versuchen: Die Summe der Kopien von L12 + L7 ist für Komplett- und für Minimal-Medium-Bedingungen gleich, obwohl die Quotienten beider Proteine entsprechend den Wuchsbedingungen sehr verschieden sind. Die Abweichung der Summe vom Mittelwert beträgt 10% in beiden Berechnungen und liegt innerhalb der Fehlerbreite (s. Weber, 1972).

Von Nomura (1969) wurde gefunden, daß Protein S6 eine Funktion während der Initiation der Proteinsynthese stimuliert und zwar die vom Initiationsfaktor IF2 abhängige Bindung der Formylmethionyl-tRNS. S6 wird

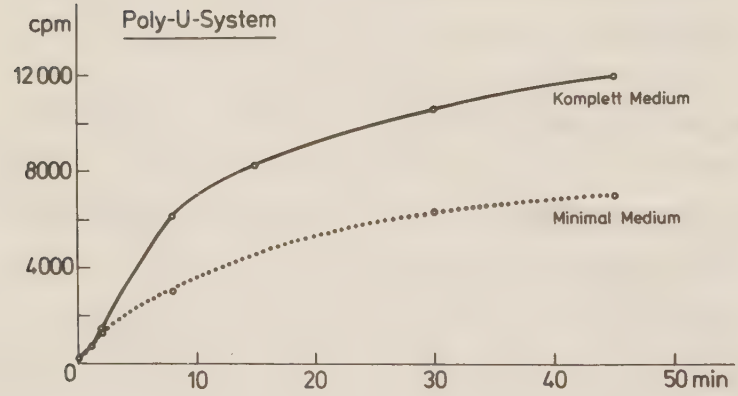
in Ribosomen aus Zellen mit verkürzter Generationszeit in stark erhöhter Menge gefunden (Tabelle 1). S21, das in Ribosomen aus Komplett-Medium ebenfalls stärker vertreten ist, hemmt in vitro stark die IF2-abhängige Formylmethionyl-tRNS-Bindung (van Duin et al,, 1972). Um zu untersuchen, ob dieser letztere Effekt auch in der Ribosomenpopulation, die den höheren Gehalt an S21 hat, gefunden wird, wurde die in vitro Proteinsynthesefunktion von Ribosomen gemessen, die aus Zellen mit unterschiedlicher Wuchsrate isoliert waren. In vorläufigen Ergebnissen wurde gefunden, daß in einem System mit natürlicher Messenger-RNS als Matrize die Proteinsynthese bei Ribosomen aus Zellen mit kurzer Generationszeit deutlich verzögert ist gegenüber Ribosomen aus Zellen mit langer Generationszeit, während bei synthetischem Messenger (Poly-U) der Anstieg beider Kurven gleichzeitig erfolgt (Abb. 1 a und b). Dieser Effekt könnte darauf zurückgeführt werden, daß die größere Menge von S21 in Ribosomen aus Komplett-Medium bei der Bildung des Initiationskomplexes am natürlichen Messenger stört. S21 sollte dann aber unter in-vivo-Bedingungen während der Initiation nicht am Ribosom sitzen, d.h. die Ribosomen sollten z.B. in Bezug auf dieses Protein heterogen sein.

d) Schlußfolgerungen

Alle bisherigen Experimente, die sich mit stöchiometrischen Messungen befassen und aus denen die Heterogeni-



a



b

Abb. 1 : Kinetik der in-vitro-Proteinsynthese von Ribosomen isoliert aus Zellen, die in Komplett- bzw. Minimal-Medium gewachsen waren. Es wurden die Impulse pro Minute (cpm) der in die synthetisierten Peptide eingebauten ^{14}C-Aminosäuren gemessen. a) Als Matrize diente m-RNS des Bakteriophagen R17, die mir von Dr. K. Nierhaus freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Versuchsbedingungen für das verwendete R17-abhängige Proteinsynthesesystem sind bei Funatsu et al.(1972) beschrieben. b) Als Matrize diente eine synthetische m-RNS, nämlich Poly-Uridin (Poly-U; Fa. Boehringer). Die Versuchsbedingungen für das Poly-U-abhängige Proteinsynthesesystem sind bei Phillips et al.(1969) beschrieben.

tät ribosomaler Populationen geschlossen wurde, haben den Nachteil, daß sie mit Partikeln ausgeführt wurden, die während ihrer Isolierung wechselnden Einflüssen ausgesetzt waren. Es konnte daher trotz sorgfältiger Kontrollen in keinem Fall ausgeschlossen werden, daß bestimmte Proteine während der Isolierung teilweise verloren gehen. Daher konnte aus den bisherigen Untersuchungen nicht ohne weiteres auf den in vivo Zustand von Ribosomen geschlossen werden.

Die Methoden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, umgehen diese Schwierigkeiten weitgehend. So wurden a) die Zellen aus den beiden unterschiedlichen Kulturen vor dem Aufbrechen gemischt. Die Bedingungen für die Aufbereitung und Isolierung der ribosomalen Proteine waren damit identisch. b) Der aus den Quotienten ablesbare relative Proteingehalt ist unabhängig von Proteinverlusten während der Aufarbeitung. Die Verluste müssen allerdings für die Ribosomenpopulationen aus den verschiedenen Medien gleich sein. Es könnte die Möglichkeit bestehen, daß Ribosomen, die unter verschiedenen Zell-Wuchsbedingungen synthetisiert werden, auch etwas verschiedene Quartärstrukturen besitzen und daß aufgrund verschiedener Konformationen einzelne Proteine auf gleiche Extraktionsbedingungen verschieden reagieren. In diesem Fall wäre der Quotient zwischen diesen Proteinen dann ebenfalls verändert.

Mit dieser Einschränkung kann aus den obigen Ergeb-

nissen geschlossen werden, daß *in vivo* Ribosomen-populationen vorhanden sind, die mit verschiedenen Sätzen ribosomaler Proteine ausgestattet sind.

Zusammenfassung

In den vorliegenden Experimenten wurde untersucht, ob auch in vivo Ribosomenpopulationen existieren, die in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung heterogen sind. Dazu wurden E.coli Zellen sowohl in Komplett- als auch in Minimal-Medium angezogen und in den verschiedenen Medien mit ^{3}H- oder ^{14}C-Aminosäuren markiert. Die unterschiedlich markierten Zellen aus den beiden Medien wurden zusammengegeben, aufgebrochen und aus dem Zellextrakt wurden die Ribosomen gewonnen. Auf diese Weise konnten die je nach ihrer Herkunft verschieden markierten ribosomalen Proteine unter identischen Bedingungen isoliert und fraktioniert werden. Für jede Proteinkomponente wurden die ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitäten bestimmt. Sie sind ein Maß für die Menge der Proteine in den Ribosomenpopulationen aus Komplett- bzw. Minimal-Medium. Der Quotient aus den verschiedenen Radioaktivitäten zeigt an, ob die einzelnen Proteine in den ribosomalen Populationen verschiedener Herkunft in vergleichbaren Mengen vorliegen.

Entsprechend ihrem Quotienten können die ribosomalen Proteine wie folgt eingeteilt werden: Ein großer Teil (ca.60%) von ihnen hat Quotienten um 1 . Das bedeutet, daß diese Proteine in gleichen Mengen in den verschiedenen Ribosomenfraktionen vorkommen. Etwa 30% aller Proteine weichen um 10% bis 25% von 1 ab; sie sind in Ribosomen aus verschiedenen Medien unterschiedlich

stark vertreten. Eine große Abweichung von 1 zeigen die Proteine S6, S21 und L12 mit Quotienten von 2,5, 2,4 und 3,1. Das heißt, daß Ribosomen aus Zellen, die in Komplett-Medium gezogen wurden, diese drei Proteine in zwei bis dreifacher Menge enthalten verglichen mit Ribosomen, die von Zellen in Minimal-Medium synthetisiert wurden.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse in Hinblick auf ribosomale Heterogenität in vivo wurde diskutiert.

T e i l B

Veränderte ribosomale Proteine in Mutanten des Bakteriums Escherichia coli

Einführung in die Problemstellung

Die Untersuchung bakterieller Mutanten ist eine sehr häufig angewandte Methode, um Funktionen der Zelle bestimmten ihr eigenen Strukturen zuzuordnen. Von dem Bakterium E. coli wurde eine große Anzahl Mutanten isoliert, die Veränderungen im Verhalten ihrer Ribosomen aufweisen.

Eine Gruppe dieser ribosomalen Mutanten wird im Gegensatz zum Wildtyp nicht im Wachstum behindert, wenn das Wuchsmedium bestimmte Mengen von Streptomycin enthält: die Ribosomen dieser Stämme sind gegen Streptomycin unempfindlich geworden (Kaji and Tanaka, 1968). Eine genauere Untersuchung dieser streptomycinresistenten Stämme läßt zwei Haupttypen erkennen. Eine erste Gruppe von Mutanten vermehrt sich mit und ohne Streptomycin im Wuchsmedium und wird als "streptomycinresistent" (str^r) bezeichnet. Eine zweite Gruppe kann sich nur in Medien vermehren, die Streptomycin enthalten und wird daher als "streptomycinabhängig" (str^d) bezeichnet (Breckenridge and Gorini, 1970). Genetische und biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß in allen Mutanten beider Gruppen ein ribosomales Protein der 30S-Untereinheit verändert ist und zwar das Protein S12 (Ozaki et al., 1969; Birge and Kurland, 1969). Mutanten aus beiden Gruppen wurden sowohl genetisch (Breckenridge and Gorini, 1970; Momose and Gorini, 1971) als auch proteinchemisch

(Funatsu and Wittmann, 1972; Funatsu et al., 1972) eingehend untersucht.

Von streptomycinabhängigen Stämmen wurden spontane und induzierte "Rückmutanten" isoliert (Hashimoto, 1960; Lewandowski and Brownstein, 1967; Apirion and Schlessinger, 1971), die streptomycinunabhängig (str^i) sind. Diese Mutanten sind keine echten Rückmutanten, da in ihnen das bei der Hinmutation veränderte Protein S12 von der "Rückmutation" nicht berührt wird. Stattdessen wird ein anderes Protein in der 30S-Untereinheit verändert (Apirion et al., 1969), das als Protein S4 identifiziert wurde (Birge and Kurland, 1970).
Es erhebt sich die Frage, ob die Suppression in str^i-Stämmen immer durch eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen S4 und S12 bedingt ist. Um dies zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die ribosomalen Proteine einer Reihe von unabhängig voneinander isolierten str^i-Mutanten auf bestimmte Veränderungen in ihrer Primärstruktur untersucht. Als Indikator diente ein verändertes elektrophoretisches Verhalten der Proteine unter den Bedingungen der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese. Da bei dieser Methode die gleichen Proteine unter gleichen Bedingungen immer in gleicher Position zueinander gefunden werden, kann die veränderte Position eines Proteins, bedingt durch unterschiedliches Molekulargewicht und/oder unterschiedliche Ladung, leicht erkannt werden.

Nach dieser gleichen Methode wurde ein weiterer Typ von ribosomalen Mutanten untersucht. Diese Mutanten sind "temperatursensitiv"; dies bedeutet, daß die Ribosomen aus den Zellen dieser Stämme bei 42°C in vitro eine stark verminderte Proteinsynthese-Aktivität zeigen verglichen mit dem Wildtyp, während bei 30°C keine Unterschiede gefunden werden (Phillips et al., 1969).

a) Streptomycinunabhängige Mutanten

Aus Zellen des Wildtyps und von vierzehn Rückmutanten zu Streptomycin-Unabhängigkeit wurden die ribosomalen Proteine extrahiert und aufgetrennt mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese. Von jeder Mutante wurde das Muster der Proteine auf der Gelplatte mit dem des Wildtyps verglichen. Bei vier von ihnen wurde eine Veränderung der Position für Protein S4 gefunden und zwar für die Stämme N422, N425, N432 und N433. Die Proteinmuster für den Wildtyp und diese Mutanten sind in den Abbildungen 2a, b und c wiedergegeben. Da alle Proteine eines Stammes unter gleichen Bedingungen auf der Gelplatte immer in genau der gleichen Lage zueinander erscheinen, müssen die Veränderungen in den Positionen von S4 als signifikant angesehen werden . Die Positionen von S4 für alle vier Mutanten sind darüberhinaus deutlich unterschiedlich. Das bedeutet, daß die Mutationen in den einzelnen Mutanten nicht identisch sind. Durch Funatsu et al. (1972) wurde dies bestätigt. Sie wiesen durch proteinchemische Untersuchungen an den S4-Proteinen dieser Stämme nach, daß die Kettenlänge in den einzelnen Mutantenformen stark variiert: S4 aus N425 ist um 9%, aus N433 um 1% kürzer als S4 aus dem Wildtyp, während S4-Protein aus N422 ungefähr 9% länger ist als das aus dem Wildtyp. Für die Mutanten N424, N428 und N430 konnte keine unterschiedli-

a

b

c

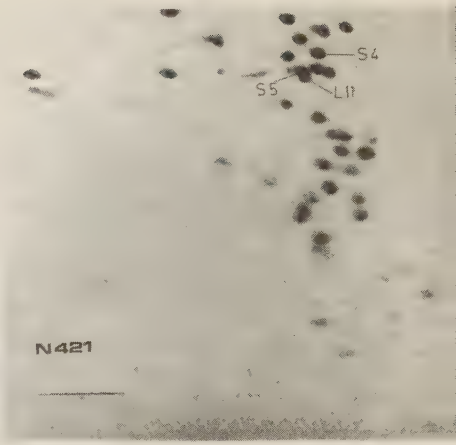
Abb. 2 : Vergleich der elektrophoretischen Muster der ribosomalen Proteine von E. coli Stamm AB774 und den Mutanten N422, N425, N432 und N433. a) Auftrennung der 70S-Proteine des Wildtyps AB774. Die Positionen von Protein S4 aus den Mutanten N432 und N433 sind durch das Dreieck bzw. den Kreis bezeichnet. b) und c) Auftrennung der 70S-Proteine aus den Mutanten N422 bzw. N425.

che Kettenlänge gegenüber dem Wildtyp gefunden werden. Wahrscheinlich treten als Folge der Mutation hier andere Aminosäure-Austausche auf.

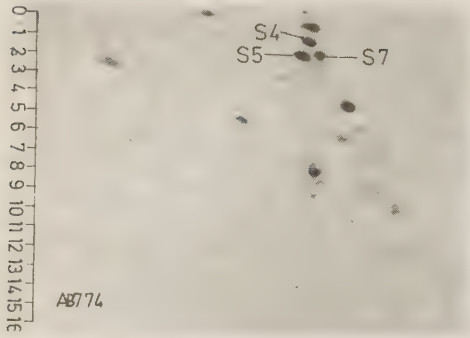
Das eletrophoretische Muster der ribosomalen Proteine aus einer weiteren Rückmutante zu Streptomycin-Unabhängigkeit, nämlich N421, ist in Abbildung 3b dargestellt. Ein Vergleich mit dem Wildtyp in Abbildung 3a zeigt, daß hier entweder die Position S5 oder L11 verändert ist. Beide Proteine befinden sich in der gleichen Position nach Auftrennung des Gesamtproteins aus den 70S-Partikeln. Um festzustellen, welches dieser beiden Proteine von der Mutation betroffen ist, wurden die Untereinheiten der Ribosomen von N421 isoliert und deren Proteine auf verschiedenen Gelplatten aufgetrennt. Aus einem Vergleich der Abbildungen 3c und d wird deutlich, daß in Stamm N421 Protein S5 die veränderte Komponente ist.

Von anderen Autoren (Bollen et al., 1969; Funatsu et al., 1971) wurde mit Hilfe biochemischer Methoden gefunden, daß eine durch Mutation bedingte Veränderung in S5 verantwortlich ist dafür, daß die Zelle resistent wird gegenüber Spectinomycin. Es stellt sich die Frage, ob eine funktionelle Beziehung besteht zwischen Streptomycin-Unabhängigkeit und Spectinomycin-Empfindlichkeit. Um dies zu testen, wurde die Proteinsynthese in vitro mit Ribosomen aus einer Kultur der Mutante N421 in Gegenwart und Abwesenheit von Spectinomycin gemessen und mit der Funktion der Wildtyp-Ribosomen ver-

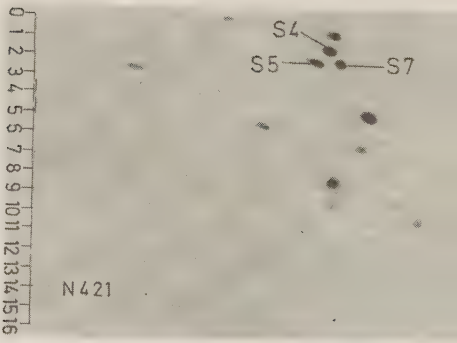
a



b



c



d

Abb. 3 : Vergleich der elektrophoretischen Muster der ribosomalen Proteine von E. coli Stamm AB774 und der Mutante N421.
a) und b) Auftrennung des Gesamtproteins der 70S-Partikeln aus AB774 bzw. N421. Da die Proteine S5 und L11 des Wildtyps die gleiche Position einnehmen, ist aus diesen Abbildungen nicht erkennbar, welches der beiden Proteine die veränderte Komponente in der Mutante ist. In Abb. 3c) und d) ist die Auftrennung der 30S-Proteine der beiden Stämme dargestellt. Hier ist erkennbar, daß S5 die veränderte Komponente ist, denn der Abstand zwischen Protein S5 und S7 beträgt 9mm für AB774 und 12mm für die Mutante N421.

glichen. Es wurden keine Unterschiede festgestellt.

In Zellen, die von Streptomycin-Sensitivität zu Streptomycin-Abhängigkeit mutiert sind, ist Protein S12 verändert (Birge and Kurland, 1969; Funatsu et al., 1972). In allen Rückmutanten zu Streptomycin-Unabhängigkeit, in denen die Mutation lokalisiert werden konnte, wird der ursprüngliche Phänotyp Streptomycin-Unabhängigkeit durch mutative Veränderung weiterer Proteine aufgehoben. Diese Befunde zeigen, daß es strukturelle und funktionelle Wechselwirkungen zwischen ribosomalen Proteinen gibt,

Es ist bekannt, daß in streptomycin-sensitiven Stämmen bei geringen Mengen von Streptomycin im Wuchsmedium ein Effekt auftritt, der als phänotypische Suppression bezeichnet wird: Aufgrund einer Veränderung in der Ablesegenauigkeit durch das Ribosom kann in geringem Maße ein letaler Defekt in der Zelle aufgehoben werden. Diese Eigenschaft geht in str^r und str^i Zellen, die wie erwähnt ein verändertes Protein S12 haben, in verschieden starkem Ausmaß verloren (Breckenridge and Gorini, 1970). Von Protein S4 ist bekannt, daß es in einer bestimmten durch Mutation veränderten Form (Rosset and Gorini,(1969) diese phänotypische Suppression ohne Streptomycin ausübt. Daraus wurde geschlossen, daß beide Proteine am Ablesevorgang während der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen darüberhinaus, daß eine funktionelle Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen besteht.

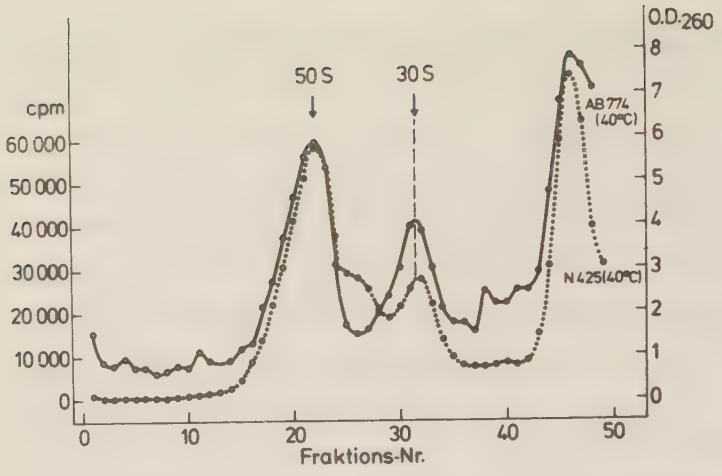
b) Spezielle Eigenschaften einer streptomycin-unabhängigen Mutante

Von besonderem Interesse ist die str^i Mutante N425. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Rückmutanten hat N425 eine Generationszeit, die bei 37°C in Komplett-Medium doppelt so lang ist wie die Generationszeit des Wildtyps, nämlich 80min. Kühlt man die Kultur auf 18°C ab, so vermehren sich die Zellen im Gegensatz zum Wildtyp nicht weiter: der Stamm ist kaltsensitiv.

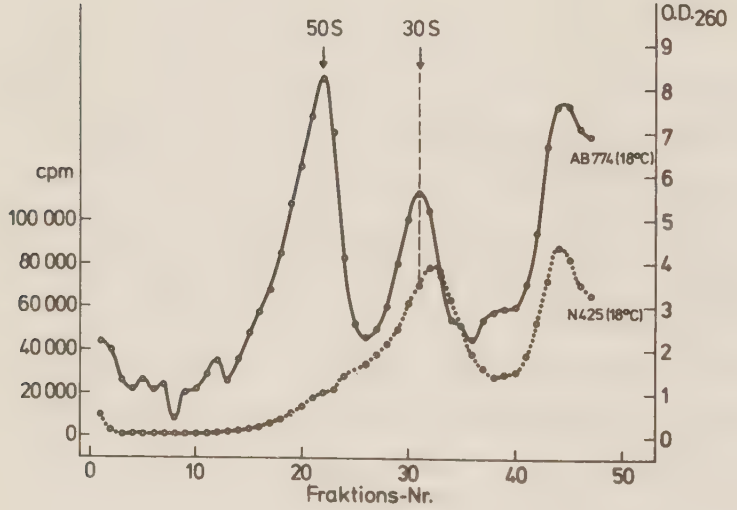
Die 70S-Partikeln aus den Zellen von N425 sind nach der Isolierung nur bei sehr hohen Magnesiumkonzentrationen ($1x10^{-1}$M) relativ stabil. Reinigt man diese Partikeln im Saccharosegradienten, so findet sich ausser dem 70S-Gipfel eine weitere Fraktion, die 50S-Partikeln enthält; es können aber keine 30S-Partikeln nachgewiesen werden. Bei verminderter Magnesiumkonzentration und teilweiser Dissoziation der 70S-Partikeln erhöht sich die Menge freier 50S-, jedoch nicht der 30S-Partikeln. Werden die 70S-Partikeln vollständig dissoziiert und danach der Gradientenanalyse unterworfen, so ist ein kleiner Gipfel bei 30S zu sehen, der bei Auftrennung alle Proteine der 30S-Untereinheit enthält. Das Mengenverhältnis dieser "30S-Partikeln" zu den 50S-Partikeln ist nach planimetrischer Abmessung etwa 1 zu 4, während es für den Wildtyp etwa 2 zu 3 ist.

Diese vorliegenden Befunde ließen vermuten, daß aufgrund der Veränderung von Protein S4 in der Mutante N425 die "30S-Partikeln" eine andere instabilere Konforma-

tion haben, die eine verminderte Funktion zur Folge haben könnte, was bedeutet, daß die Zellen langsamer wachsen. Um dies zu testen, wurden im Saccharosegradienten mit ^{3}H-Uridin markierte dissoziierte Ribosomen aus einer Kultur von N425 mit einem zwanzigfachen Überschuß unmarkierten dissoziierten Ribosomen des Wildtyps aufgetrennt (Abb.4a). Während die große Untereinheit aus beiden Kulturen gleich schnell sedimentiert, wird für die kleine Untereinheit eine leichte Differenz gefunden: Die Partikeln aus der Mutante sedimentieren etwas langsamer als die 30S-Partikeln aus dem Wildtyp. Da aber bei einer Auftrennung der Proteine der kleinen Untereinheit aus der Mutante alle Komponenten gefunden wurden, wird aus den Befunden geschlossen, daß die Konformation dieser Partikeln verändert ist. Eine noch weitere Auffaltung, d.h. eine noch größere Differenz im Sedimentationsverhalten gegenüber den Wildtyp-30S, wurde unter gleichen Versuchsbedingungen für die Partikeln gefunden, die bei 18°C gebildet waren (Abb.4b). Es ist noch bemerkenswert, daß in den Mutantenzellen im Gegensatz zum Wildtyp keine 50S-Partikeln mehr gebildet wurden. Dieser Befund stimmt mit Versuchen von Guthrie et al. (1969) und Nashimoto und Nomura (1970)überein, aus denen geschlossen wurde, daß die Biosynthese von 50S-Untereinheiten von der Biosynthese intakter 30S-Partikeln abhängt.



a



b

Abb. 4 : Auftrennung der 30S- und 50S-Untereinheiten von E.coli Stamm AB774 und der Mutante N425 im Saccharosegradienten. Die mit ^{3}H-Uridin markierten Zellen von N425 aus 40ml Kultur waren den unmarkierten Zellen von AB774 aus 800ml Kultur vor dem Aufbrechen beigemischt worden. a) Die Zellen von AB774 und N425 wurden bei 40°C angezogen; 90 min vor dem Ernten wurden der Kultur von N425 50 µC ^{3}H-Uridin zugegeben. b) Die Zellen von AB774 wurden bei 18°C angezogen. Die Zellen von N425 wurden bis zur mittleren logarithmischen Phase bei 40°C bebrütet; die Kultur wurde dann auf 18°C abgekühlt und für 100 min weiterbebrütet. 10 min nach der Abkühlung wurden 200 µC ^{3}H-Uridin zugegeben.

c) Temperatursensitive Mutanten

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese wurde noch eine weitere Gruppe von ribosomalen Mutanten untersucht. Die Aktivität der Ribosomen aus diesen Stämmen ist in einem in-vitro-Proteinsynthese-System bei 30°C so groß wie die Aktivität der Ribosomen aus dem Wildtyp. Bei 42°C zeigen die Mutantenribosomen dagegen keine oder stark reduzierte Funktion verglichen mit den Wildtypribosomen.
Unter 12 dieser getesteten temperatursensitiven Mutanten wurde in zwei Stämmen Protein S8 in einer anderen Position im Elektrophaerogramm gefunden (Abb.5).
In beiden Fällen ist das elektrophoretische Verhalten des Proteins in der ersten Dimension stark verändert. Da bei diesem Schritt während der Elektrophorese die Proteine vorwiegend nach ihrer Ladung aufgetrennt werden, kann geschlossen werden, daß bei diesen Mutanten eine Ladungsänderung in S8 die Ursache für die Temperatursensitivität ist. Weitere Untersuchungen an diesen Mutanten sind im Gange (Gaunt und Erdmann, unpubliziert).

d) Schlußfolgerungen

Zur Aufklärung der Funktion von ribosomalen Proteinen sind ribosomale Mutanten sehr wertvoll, wenn die Mutation einer bestimmten ribosomalen Komponente zugeordnet werden kann. Die Methoden, die bisher entwickelt wurden, um mutative Veränderungen in ribosomalen Proteinen zu erkennen, sind sehr aufwendig und zeitraubend (Ozaki et al., 1969; Birge and Kurland, 1969).
In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß es mit Hilfe der

zweidimensionalen Gel-Elektrophorese möglich ist, solche Mutanten schnell zu identifizieren. Allerdings muß die Veränderung die Wanderung des Proteins im elektrischen Feld verändern, d. h., es müssen das Molekulargewicht und/oder die Ladung differieren. In den vorliegenden Untersuchungen konnten in 26% der untersuchten str^i-Mutanten und in 20% der temperatursensitiven Mutanten veränderte Proteine identifiziert werden.

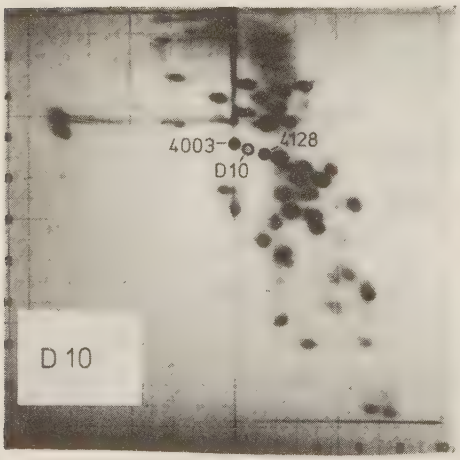


Abb. 5 : Elektrophoretische Auftrennung der 70S-Proteine von E.coli D10 (Wildtyp). Die Position für Protein S8 ist durch einen Kreis markiert. Die Positionen für S8 aus den Mutanten N4003 und N4128 sind durch einen ausgefüllten Kreis bezeichnet.

Zusammenfassung

Es wurden vierzehn verschiedene E. coli Stämme untersucht, die spontan von Streptomycin-Abhängigkeit zu -Unabhängigkeit rückmutiert waren. Die ribosomalen Proteine dieser Mutanten wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese analysiert. Im Elektropherogramm sind die einzelnen Proteine nach der Auftrennung aufgrund ihrer relativen Lage zueinander identifizierbar. Änderungen im elektrophoretischen Verhalten eines Proteins können leicht aufgrund der veränderten Position dieses Proteins erkannt werden. In vier der untersuchten Mutanten wurden veränderte S4-Proteine gefunden. Bei einer weiteren Mutante war Protein S5 verändert. Für die ursprüngliche Mutation von Streptomycin-Abhängigkeit zu -Unabhängigkeit ist aber eine Veränderung in Protein S12 verantwortlich. Dieser Befund bedeutet, daß in allen fünf Rückmutanten der Phänotyp Streptomycin-Abhängigkeit durch eine "Supressor-Mutation " in einem anderen Gen unterdrückt wird.

Bei der Untersuchung der ribosomalen Proteine einer Gruppe von temperatursensitiven Mutanten wurde in zwei Fällen ein verändertes S8 Protein gefunden. Diese Mutanten werden von anderer Seite weiter untersucht.

Diskussion

Mit fortschreitender Kenntnis der Feinstruktur der Bakterienribosomen wurde eine Reihe von Modellen über die Funktion dieser Partikeln entwickelt. Alle diese Modelle sind noch unvollständig und für keines konnte seine Gültigkeit nachgewiesen werden. Man weiß heute, daß das Ribosom während der drei Stadien der Proteinbiosynthese, der Initiation, Prolongation und Termination, zahlreiche Einzelfunktionen ausführt. Trotz der guten Kenntnis der Struktur seiner Einzelkomponenten, der ribosomalen RNS und ribosomalen Proteine, kann über deren spezifische Funktion jedoch wenig ausgesagt werden. Dies ist aber nötig, wenn der komplexe Vorgang der Proteinsynthese auf molekularer Ebene verstanden werden soll.

Die meisten der bisher angewandten Methoden der Funktionsanalyse haben den Nachteil, daß sie für das Ribosom unnatürliche Bedingungen bieten, so daß aus den gefundenen Ergebnissen nicht ohne weiteres auf die ursprüngliche Funktion geschlossen werden kann. Die in vitro gefundene Heterogenität ribosomaler Partikeln bietet eine Möglichkeit, unter weitgehend physiologischen Bedingungen Funktionsanalysen durchzuführen (van Duin and Kurland, 1970; Randall-Hazelbauer and Kurland, 1972; van Duin et al., 1972). In Teil A dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß diese strukturelle Heterogenität mit großer Wahrscheinlichkeit auch in der lebenden

Zelle vorkommt und daß sie aller Voraussicht nach funktionelle Bedeutung hat. Der mögliche Einwand, daß diese Heterogenität aufgrund verschiedener Konformationen des Ribosoms artifiziell sei, muß noch durch weitere Experimente, in denen die Proteinzusammensetzung von Partikeln mit verschiedener Konformation getestet wird, ausgeschaltet werden. Ein direkter Beweis für ribosomale Heterogenität in vivo wäre allerdings das Auffinden von Teilfraktionen von Ribosomen, die aufgrund ihrer einheitlichen Funktion (z.B. Initiation) homogen sind. Dieser Nachweis ist aufgrund technischer Schwierigkeiten z.Zt. nicht möglich.

Die in vivo Gültigkeit ribosomaler Heterogenität bietet eine Möglichkeit, die in vitro gefundenen Ergebnisse mit der in-vivo-Situation zu vergleichen:

Die in der vorliegenden Arbeit gewählten verschiedenen Wachstumsbedingungen zwingen die Zelle einmal dazu, andere Gene zu "lesen", d.h. für die Translation andere Messenger zur Verfügung zu stellen; zum anderen haben sie eine veränderte Generationszeit der Zelle zur Folge. Welche dieser beiden Änderungen die gefundene Änderung in der Ribosomenpopulation bedingt, kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht abgelesen werden. Aus anderen Synthesesystemen, wie z.B. der Transkription, ist bekannt, daß eine Regulation der Messenger-Produktion durch die Regulation der Initiationshäufigkeit erfolgt. Um die Möglichkeit einer ähnlichen Regulation

für die vorliegenden Ergebnisse zu testen, müßte unter Beibehaltung aller anderen Versuchsbedingungen die Generationszeit geändert werden, d.h. die Translation müßte für die gleichen Messenger gelten. Diese Bedingungen sind bei Verwendung einer im Transportsystem geschädigten Mutante gegeben. Eine Untersuchung der Ribosomen einer solchen Mutante mit Hilfe der in Teil A der Arbeit beschriebenen Methoden ist in Vorbereitung.

Es ist z.Zt. nicht möglich, die insgesamt 54 ribosomalen Proteine auf alle ribosomalen Funktionen hin zu untersuchen. Allerding bietet die in Teil A angewandte Methode die Möglichkeit, Funktionen von Gruppen ribosomaler Proteine zu testen. Durch geeignete Änderung der Bedingungen für die Zellen (z.B. Medien, Stoffwechselmutanten, Temperatur) oder durch Isolierung bestimmter Ribosomenpopulationen (z.B. native Untereinheiten oder Polysomen) und durch einen Vergleich der Proteinzusammensetzung dieser Ribosomen könnten bestimmte Funktionen für bestimmte Proteine zumindest wahrscheinlich gemacht , andere ausgeschlossen werden. Das Auffinden neuer "fractional" Proteine unter veränderten Bedingungen (s. z.B. Protein L10, S20 und L16) ermöglicht es darüberhinaus, weitere Proteine durch Erhöhung der aktiven Partikeln (s.a. Einleitung) auf ihre Funktion hin zu testen.

Eine experimentelle Voraussetzung für die Durchführung der Versuche in Teil A war die schnelle und saubere

Trennung möglichst aller ribosomalen Proteine. Diese Voraussetzung war durch die Anwendung der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese als Trennmethode gegeben. Eine weitere Eigenschaft dieser Methode wurde in Teil B der Arbeit genutzt, nämlich die Tatsache, daß die einzelnen Proteine eine bestimmte reproduzierbare relative Lage zueinander auf der Gelplatte einnehmen. Veränderungen ihrer Positionen werden durch Veränderung in den entsprechenden Proteinen bedingt. Obwohl mit Hilfe dieser Methode nur ein Teil der mutativ veränderten Proteine identifiziert werden kann, bietet sie doch durch ihre Einfachheit eine wichtige Möglichkeit, veränderte Ribosomenproteine für die folgenden analytischen und funktionellen Untersuchungen zu finden. Darüberhinaus kann eine gewisse Aussage über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der veränderten Mutantenproteine mit Hilfe dieser Methode gemacht werden. Auf diese Weise ergeben sich mit relativ wenig Aufwand Anhaltspunkte über die Proteineigenschaften, die durch die Mutation verändert sind. Die auf diese Weise gewonnenen ersten Erkenntnisse wurden bisher durch die nachfolgenden aufwendigen proteinchemischen Methoden bestätigt und erweitert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die in Teil A und B der Arbeit erarbeiteten Methoden einmal die Möglichkeit der Identifizierung von Veränderungen bei ribosomalen Proteinen bieten. Sie erlauben darüberhinaus gewisse Aussagen über bestimmte Funktionen die-

ser Proteine. Ihr Hauptwert liegt aber in der Möglichkeit, die in vitro und in vivo Funktionen von ribosomalen Proteinen zu vergleichen.

Literaturverzeichnis

Apirion, D. : Altered ribosomes in a suppressor strain of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 16, 285 (1966)

Apirion, D., Schlessinger, D. : Reversion from streptomycin dependence in Escherichia coli by a further change in the ribosome.
J. Bact. 94, 1275 (1967)

Apirion, D., Schlessinger, D., Phillips, S., Sypherd, P. : Escherichia coli: Reversion from streptomycin dependence, a mutation in a specific 30S ribosomal protein.
J. Mol. Biol 43, 327 (1969)

Birge, E.A., Kurland, C.G. : Altered ribosomal protein in streptomycin-dependent Escherichia coli.
Science 166, 1282 (1969)

Birge, E.A., Kurland, C.G. : Reversion of a streptomycin-dependent strain of Escherichia coli.
Molec. Gen. Genetics 109, 356 (1970)

Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M., Mizushima, S. : Ribosomal proteins confering sensitivity to the antibiotic spectinomycin in E. coli.
Science 165, 85 (1969)

Breckenridge, L., Gorini, L. : Genetic analysis of streptomycin resistance in Escherichia coli.
Genetics 65, 9 (1970)

Brownstein, B.L., Lewandowski, L.J. : A mutation suppressing streptomycin dependence; I. An effect on ribosome function.
J. Mol. Biol., 25, 99 (1967)

Craven, G.R., Voynow, P., Hardy, S.J.S., Kurland, C.G. : The ribosomal proteins of Escherichia coli. II. Chemical and physical characterization of the 30S ribosomal proteins. Biochemistry 8, 2906 (1969)

Croxton, F.E.: Elementary statistics. Dover Publications, Inc., New York (1953)

Deusser, E., Stöffler, G., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XIV. Altered S4 proteins in Escherichia coli revertants from streptomycin dependence to independence. Molec. Gen. Genetics 109, 298 (1970)

Duin, van, J., Kurland, C.G. : Functional heterogeneity of the 30S ribosomal subunit of E. coli. Molec. Gen. Genetics 109, 169 (1970)

Duin, van, J., Knippenberg, van, P.H., Dieben, van, M., Kurland, C.G. : Functional heterogeneity of the 30S ribosomal subunit of Escherichia coli. II. Effect of S21 on initiation. Molec. Gen. Genetics, in press (1972)

Dzionara, M., Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XIII. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of Escherichia coli. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 1909 (1970)

Fogel, S., Sypherd, P.S. : Chemical basis for heterogeneity of ribosomal protein. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 59, 1329 (1968)

Funatsu, G. Schiltz, E., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XXVII. Localization of the amino acid exchanges in protein S5 from two Escherichia coli mutants resistent to spectinomycin Molec. Gen. Genetics 114, 106 (1971)

Funatsu, G., Puls, W., Schiltz, E., Reinbolt, J., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XXXI. Comparative studies on altered proteins S4 of six Escherichia coli revertants from streptomycin dependence.
Molec. Gen. Genetics 115, 131 (1972)

Funatsu, G., Nierhaus, K., Wittmann-Liebold, B. : Ribosomal proteins XXII. Studies on the altered protein S5 from a spectinomycin-resistant mutant of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 64, 201 (1972)

Funatsu, G., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins

J. Mol. Biol., in press (1972)

Gesteland, R.F. : Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of E. coli
J. Mol. Biol 16, 67 (1966)

Guthrie, C., Nashimoto, H., Nomura, M. : Studies on the assembly of ribosomes in vivo.
Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 34, 69 (1969)

Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G. : The ribosomal proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins.
Biochemistry 8, 2897 (1969)

Hasenbank, R., Maschler, R., Stöffler, G. : in press (1972)

Hindennach, I., Stöffler, G., Wittmann, H.G. : Isolation of the proteins from 30S ribosomal subunits of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 23, 7 (1971a)

Hindennach, I., Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. : Isolation of proteins from 50S ribosomal subunits of Escherichia coli
Eur. J. Biochem. 23, 12 (1971b)

Kaji, H., Tanaka, Y. : Binding of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits.
J. Mol. Biol., 32, 221 (1968)

Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Donner, D., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins I. Isolation, amino acid composition, molecular weights and peptide mapping from Escherichia coli ribosomes.
Molec. Gen. Genetics 100, 364 (1967)

Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XV. Amino acid compositions of isolated ribosomal proteins from 30S and 50S subunits of Escherichia coli.
Molec. Gen. Genetics 109, 292 (1970)

Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.
Anal. Biochem. 36, 401 (1970a)

Kaltschmidt E., Wittmann, H.G. : Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 1276 (1970b)

Kischa, K., Möller, W., Stöffler, G. : Reconstitution of a GTPase activity by a 50S ribosomal protein from Escherichia coli.
Nature (Lond.) 233, 62 (1971)

Kurland, C.G., Voynow, P., Hardy, S.J.S., Randall, L., Lutter, L. : Physical and functional heterogeneity of ribosomes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 17 (1969)

Momose, H., Gorini, L. : Genetic analysis of streptomycin dependence in Escherichia coli.
Genetics 67, 19 (1971)

Moore, P.B., Traut, R.R., Noller, M., Pearson, P., Delius, H. : Ribosomal proteins of Escherichia coli II. Proteins from the 30S subunit.
J. Mol. Biol., 31, 441 (1968)

Mora, G., Donner, D., Thammana, P., Lutter, L., Kurland, C.G. Craven, G.R. : Purification and characterization of 50S ribosomal proteins of Escherichia coli.
Molec. Gen. Genetics 112, 229 (1971)

Nashimoto, H., Nomura, M. : Structure and function of bacterial ribosomes XI. Dependence of 50S ribosomal assembly on simultaneous assembly of 30S subunits.
Proc. nat. Acad. Sci. 67, 144o (1970)

Nomura, M., Mizushima, S., Ozaki, M., Traub, P., Lowry, C.V.: Structure and function of ribosomes and their molecular components.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 49 (1969)

Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M., : Identification and functional characterization of the protein controlle by the streptomycin-resistant locus in E. coli.
Nature 222, 333 (1969)

Phillips, S.L., Schlessinger, D., Apirion, D. : Mutants in Escherichia coli ribosomes: A new selection.
Genetics 62, 772 (1969)

Randall-Hazelbauer, L., Kurland, C.G. : Identification of three 30S proteins contributing to the ribosomal A site.
Molec. Gen. Genetics, in press (1972)

Retsema, J.A., Conway, T.W. : Reversible dissociation of Escherichia coli ribosomes by N-ethylmaleimide. Biochim. Biophys. Acta 179, 369 (1969)

Rosset, R., Gorini, L. : A ribosomal ambiguity mutation. J. Mol. Biol 39, 95 (1969)

Terhorst, C.P., Wittmann-Liebold, B., Möller, W. : Europ. J. Biochem., in press (1972)

Thammana, P., Weber, H.J., Deusser, E., Maschler, R., Kurland, C.G., Stöffler, G., Wittmann, H.G. : Structural and functional evidence for a repeated protein in Escherichia coli ribosomes. Manuscript in preparation (1972)

Tissières, A., Watson, J.D. : Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. Nature 182, 778 (1958)

Tissières, A., Watson, J.D., Schlessinger, D., Hollingworth, B.R. : Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 1, 221 (1959)

Traut, R.A., Moore, P.R., Delius, H., Noller, H., Tissières, A. : Ribosomal proteins of Escherichia coli. Demonstration of different primary structures. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 1294 (1967)

Traut, R.A., Delius, H., Ahmad-Zadeh, C., Bickle, T.A., Pearson, P., Tissières, A. : Ribosomal proteins of Escherichia coli: stoichiometry and implication for ribosome structure. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 25 (1969)

Voynow, P., Kurland, C.G. : Stoichiometry of the 30S ribosomal proteins of Escherichia coli. Biochemistry 10, 517 (1971)

Weber, H.J. : Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from E. coli. submitted to publication (1972)

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
E. coli	=	Escherichia coli
cpm	=	Impulse pro Minute (counts per minute)
dpm	=	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
IF2	=	Initiationsfaktor 2
min	=	Minute
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
r-RNS	=	ribosomale Ribonukleinsäure
sts	=	starvation temperature sensitive

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Wittmann durchgeführt. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas und für die Diskussionen während der Arbeit. Herrn H.J. Weber danke ich für seine Hilfe, Dr. D. Beyersmann für die kritische Durchsicht des Manuskripts und Frl. J. Müßig für ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

Lebenslauf

Ich, Ellen Deusser, bin am 7.April 1932 als Tochter des Chemikers und Arztes Dr. Reinhold Deusser und seiner Ehefrau Susanne, geb. Fischer in Frankfurt/Main geboren. Ich besuchte das Gymnasium in Frankfurt/Main, Bad Homburg und Oberursel/Ts. bis einschließlich Unterprima. Nach anschließender zweijähriger Ausbildung an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg/Lahn machte ich das Staatsexamen als Säuglings- und Kinderschwester und war danach mehrere Jahre in diesem Beruf tätig. In einer privaten Abendschule bereitete ich mich auf die externe Abiturprüfung vor, die ich 1963 an der Ulrich v. Hutten-Schule in Schlüchtern/Hessen ablegte. Von 1963 bis 1968 studierte ich Biologie an der Universität Frankfurt/Main mit Abschluß der Diplomhauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Botanik. Meine Diplomarbeit fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. Winkler an der Universität Bochum über das Thema " Nachweis von Unsinn-Tripletts in wirtsabhängigen Mutanten der Phagen Kappa, Af8 und Chi" an. Seit September 1969 bin ich am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der Abteilung von Prof. Dr. Wittmann als Doktorandin tätig.